

後期糖化反応生成物受容体遺伝子の発現誘導機構と 糖尿病性細小血管症発症, 進展における役割

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)
金沢大学医学部医学科生化学第二講座 (主任: 山本 博教授)

藤 森 英 希

糖尿病状態においては循環血液中や組織で後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) が加速的に形成され, 糖尿病性細小血管症の発症に深く関わっていることが明らかとなってきた。近年また, AGEを認識する細胞表面レセプター (receptor for AGE, RAGE) が様々な細胞の機能異常を引き起こしていることが知られてきた。しかし, RAGE遺伝子の発現調節機構やその病態生理学的な意義についてはほとんど明らかでない。そこで本研究では, 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 17 β -エストラジオールならびにAGEリガンドが細小血管構成細胞種の一つである周皮細胞におけるRAGE遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかにつき検討した。その結果, TNF- α , 17 β -エストラジオール, AGEはRAGE mRNAを増加させた。これらの因子によってRAGE mRNAの安定性は影響を受けず, したがって当該遺伝子の発現誘導は主として転写の促進によると考えられた。TNF- α と17 β -エストラジオールはRAGE蛋白量を増大させ, さらにTNF- α はAGEの周皮細胞の増殖抑制効果を増強した。以上の結果から, これらの因子により誘導されるRAGEは, 周皮細胞におけるAGE作用を助長させ, 周皮細胞の選択的喪失を含む糖尿病性細小血管症の進展, 増悪に関与する可能性が考えられた。

Key words pericyte, advanced glycation endproducts (AGE), receptor for AGE (RAGE)

ブドウ糖などの還元糖は蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応し, Schiff塩基, アマドリ化合物を経て, その後緩徐にはあるが不可逆的な脱水, 縮合等の反応を繰り返し特有の蛍光を持つ黄褐色の物質, 後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) を形成することが知られている¹⁾ (図1)。慢性的な高血糖状態では循環血液中や組織でAGEが加速的に形成, 蓄積され, 糖尿病性血管症の発症に深く関わっていることが報告されてきた²⁾³⁾。

さらに近年, AGEを認識する細胞表面レセプターが複数種見い出された^{4)~6)}。なかでもAGE受容体 (receptor for AGE, RAGE) (図2) は1992年にSternら⁶⁾によってクローニングされたAGE受容体で血管を構成する血管内皮細胞やそれを取り巻く平滑筋細胞, 周皮細胞などの様々な細胞で発現しており⁷⁾⁸⁾, 糖尿病性網膜症に特徴的な周皮細胞の選択的喪失や血管新生過程に関与することが明らかとなってきた^{8)~10)}。しかし, RAGE遺伝子の発現調節の分子機構についてはほとんど明らかでない。

そこで本研究では, 初代培養ウシ網膜周皮細胞を用いてRAGE遺伝子の発現に及ぼす腫瘍壊死因子 (tumor necrosis

factor- α , TNF- α), 17 β -エストラジオール, AGEリガンドの影響につき検討した。さらに, TNF- α により周皮細胞膜表面のRAGE蛋白が誘導された条件下でAGEによる周皮細胞の増殖抑制効果が増悪されるかどうかについても検討を行い, 糖尿病性網膜症とくに周皮細胞の喪失におけるAGE-RAGE系の役割につき考察した。

材料および方法

I. AGEの調製

ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (フラクションV, 脂肪酸不含, エンドトキシン不含, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) を500 mMグルコースを含む10 mMリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) と37℃で無菌的に6週間インキュベーションした⁸⁾。その後, 透析により遊離グルコースを除去し, ヘパリンセファロースカラムCL-4B (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) クロマトグラフィーでAGE化BSAを未反応BSAから分離した。高分子化をSDS-PAGEで, また特異吸光, 蛍光を分光光学的方法で確認後¹⁰⁾, 精製AGE-BSA標品の蛋白濃度を

平成9年11月27日受付, 平成10年1月13日受理

Abbreviations : AGE, advanced glycation endproducts; BSA, bovine serum albumin; NF- κ B, nuclear factor kappa B; PBS, phosphate-buffered saline; RAGE, receptor for AGE; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SSPE, saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha.

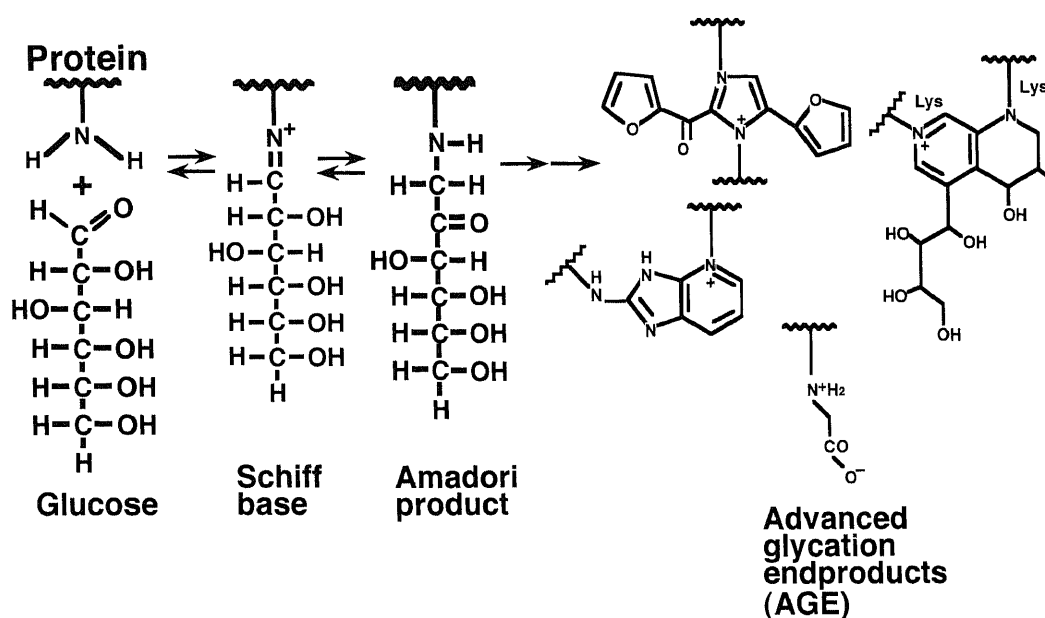


Fig. 1. The Maillard reaction between glucose and proteins to form AGE.

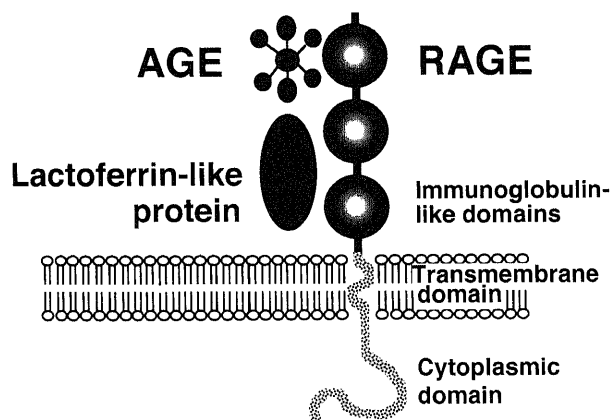


Fig. 2. A schematic representation of the structure of RAGE protein.

Bradford法で定量した¹¹⁾.

II. 細胞

1. 血管周皮細胞

ウシ眼球より初代培養した網膜周皮細胞¹²⁾を用いた。細胞は牛胎児血清(Cell Culture Laboratories, Cleveland, USA), 100 U/mlペニシリン(和光純薬, 大阪), 100 µg/mlストレプトマイシン(和光純薬)を含むダルベッコ改変イーグル培地(日本製薬, 東京)にて維持した。95%以上の細胞が α -平滑筋アクチン陽性で周皮細胞と同定された。

III. DNAの化学合成

1. プライマーおよびプローブ

RAGE mRNA検出用プライマー, プローブとして以下のオリゴデオキシリボヌクレオチドを設計し, フォスファミダイド法によりDNA合成装置モデル392 (Applied Biosystems, USA) を

用いて化学合成した。合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはOPCカラム (Applied Biosystems) で精製した。プライマーの塩基配列は 5'-ATGGAACTGAACACAGGCC-3' (RAGE-U: cDNA塩基番号150-169^{6,8)}に対応) と 5'-CACACATGTCCCCACCTTAT-3' (RAGE-D: 同435-416^{6,8)}に対応), プローブの配列は 5'-GCCGGACAGAAGCTTGGA-3' (RAGE-P: 同167-184⁸⁾に対応)である。ウシ β -アクチンmRNAに対するプライマーおよびプローブの配列はNomuraら¹³⁾に従った。

IV. 総RNAの分離

種々の条件下で培養した周皮細胞からChomczynskiら¹⁴⁾の方法に基づきアイソゲン (ニッポンジーン, 富山) を用いて総RNAを抽出精製した。すなわち, まず1フラスコあたり1 mlのアイソゲンを加え室温で5分間静置後, 0.2 mlのクロロホルムを加えて激しく振盪し, 4℃, 12,000xgにて15分間遠心した。つぎに, 上清を回収しイソプロパノールを0.5 ml加え室温で5分間放置し, 4℃, 12,000xg 10分間の遠心でRNAを沈澱させた。沈澱物を75%エタノールで洗い減圧乾燥した後, 滅菌水に溶解し吸光定量を行い至適濃度に調整した。

V. 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) とその産物のサザンブロット解析

GeneAmp RNA PCR キット (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) を用い, まず総RNA, あるいはポリ(A)⁺RNAを鋳型として逆転写酵素にてcDNAを合成し, ついでRAGE mRNAに特異的なプライマーを用いTaq DNAポリメラーゼにてcDNA断片を増幅した。反応にはDNAサーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を使用した¹⁵⁾。増幅産物を2%アガロースゲルにて電気泳動後, ナイロンフィルター (Amersham, Buckinghamshire, UK) に転写し, 紫外線にて固定した。フィルターを50%ホルムアミド, 5x [食塩-リン酸ナトリウム-エチレンジアミン四酢酸液 (saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid, SSPE)], 5x Denhardt液 (0.1%ポリビニルピロリド

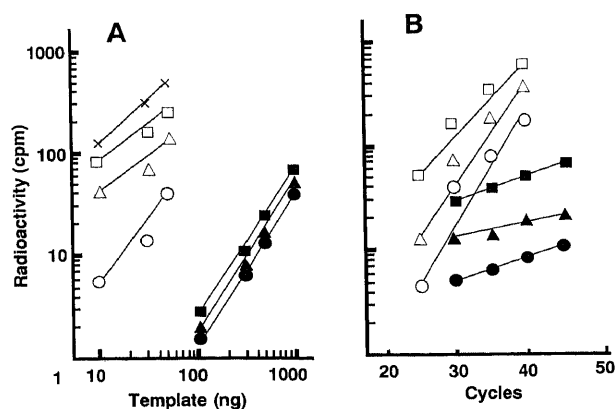


Fig. 3. Titration of RT-PCR signals in functions of template amounts (A) and of cycle numbers (B). (A) ○; 25 cycles, △; 30 cycles, □; 35 cycles, X; 40 cycles amplification of poly(A)⁺ RNA. ●; 35 cycles, ▲; 40 cycles, ■; 45 cycles amplification of total RNA. (B) ○; 10 ng, △; 30 ng, □; 50 ng of poly(A)⁺ RNAs were amplified. ●; 300 ng, ▲; 500 ng, ■; 1000 ng of total RNAs were amplified.

ン, 0.1% BSA, 0.1% フィコール), 1% SDS, 500 μ g/ml 変性サケ精子 DNA (Sigma, St. Louis, USA) からなる溶液中で 50℃, 4 時間前ハイブリダイゼーションさせた後, 50%ホルムアミド, 5xSSPE, 5 x Denhardt 液, 1% SDS, 500 μ g/ml 変性サケ精子 DNA, ³²P 標識オリゴヌクレオチドプローブ 10 pmole からなる溶液中で 50℃, 16 時間ハイブリダイゼーションさせた. プローブ標識には, DNA5'末端標識キット (宝酒造, 京都) と [γ -³²P] アデノシン三リン酸 (NEN Research Product, Boston, USA) を使用した⁸⁾. ハイブリダイゼーション後, フィルターを 2xSSC, 0.1% SDS にて室温で 15 分間洗浄し, -80℃ でオートラジオグラフィーを行った. シグナル強度の測定はバイオイメージアナライザー FUJIX BAS1000 (富士フィルム, 浜松) で行った.

Ⅵ. RAGE mRNA 安定性の解析

ヒト組換え型 TNF- α (Collaborative Research, Bedford, USA), 17 β -エストラジオール (Sigma, St. Louis, USA), AGE-BSA による RAGE mRNA 誘導の分子機構を明らかにするため, 各刺激下における RAGE mRNA の半減期を測定した¹⁰⁾. すなわち, 周皮細胞を 100 ng/ml TNF- α , 10 nM 17 β -エストラジオール, 2 mg/ml AGE-BSA 存在, 非存在下で 4 時間培養した後, 最終濃

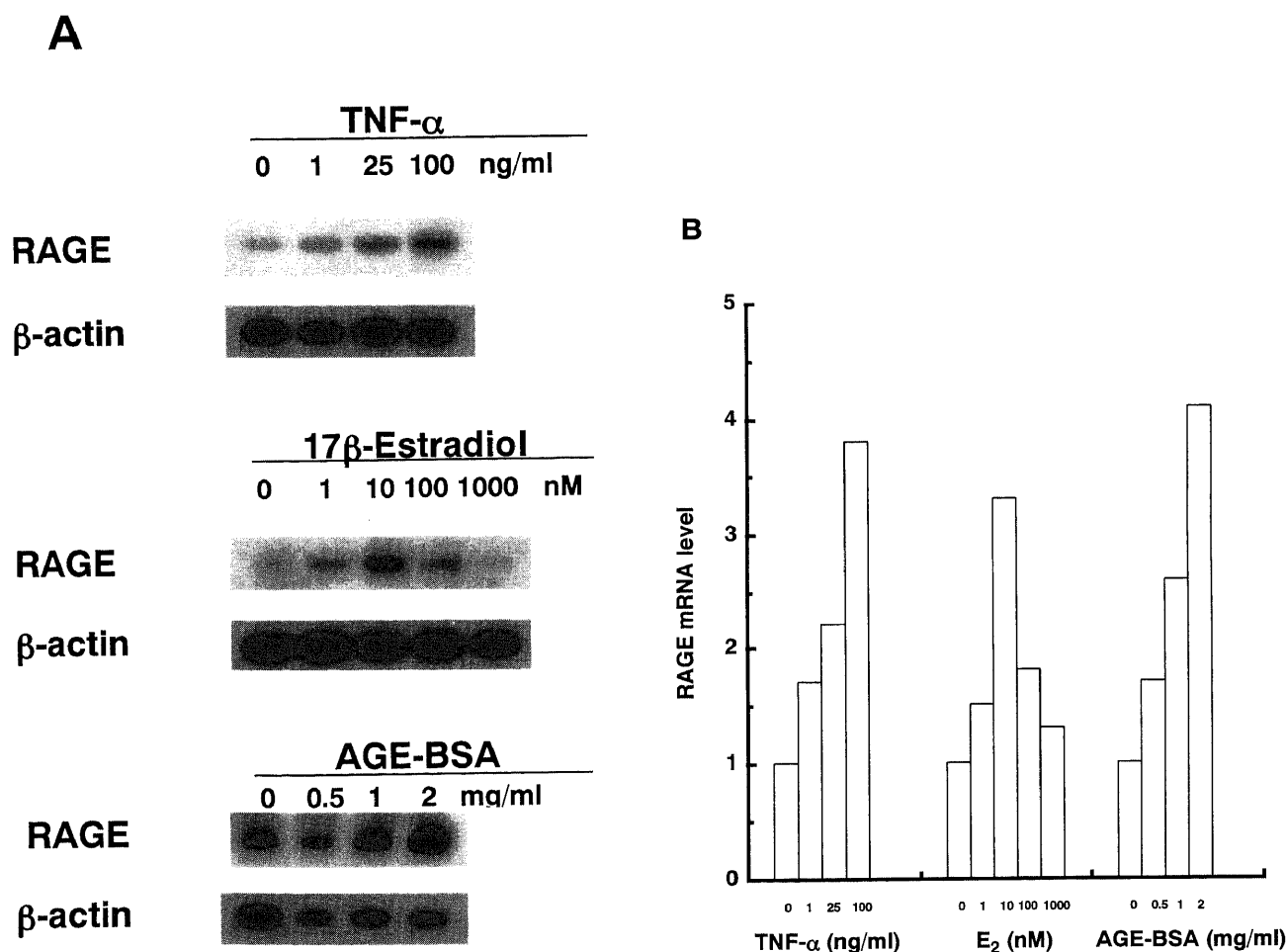


Fig. 4. Effects of TNF- α , 17 β -estradiol and AGE-BSA on RAGE mRNA level in pericytes. (A) Dose-dependence. Pericytes were incubated for 4 h with the indicated concentrations of TNF- α , 17 β -estradiol or AGE-BSA, and then poly(A)⁺ RNAs were isolated and analyzed by RT-PCR. (B) Quantitative representation of the RAGE gene induction. Data were normalized by the intensity of β -actin mRNA-derived signals, and related to the value without additives. E₂, 17 β -estradiol.

度10 μ g/mlのアクチノマイシンD (Sigma) で転写を停止させた。この後一定時間ごとに総RNAを分離し、定量的RT-PCR法によりRAGE mRNA量を測定した。

Ⅶ. ウェスタンブロット法による周皮細胞RAGE蛋白の検出
周皮細胞をPBSで洗浄後、細胞可溶化緩衝液 (10 mM PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5 % デオキシコレート, 0.1 % SDS, 10 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM オルソバナジル酸ナトリウム (Sigma), 50 mM NaF (和光純薬), 10 mM ピロリン酸ナトリウム (Sigma), 1 μ g/ml アプロチニン (Boehringer Mannheim GmbH), 2 mM フェニールメチルスルホニルフロライド (Sigma)) で可溶化し、4 $^{\circ}$ C, 300xgにて15分間遠心した。その後、Bradford法にて遠心上清の蛋白定量を行い、30 μ g相当を12.5%SDS-PAGE法にて電気泳動し、ニトロセルロース膜 (Amersham) に転写した。ニトロセルロース膜を5%脱脂粉乳含有0.1% ツイーン20添加Tris緩衝液で16時間ブロッキングした後、5 μ g/ml 抗ヒトRAGEモノクローナル抗体 (京都大学医学部土井俊夫講師より供与) と60分間室温で反応させた。さらに2000倍に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGノグロブリン抗体 (Amersham) を二次抗体として室温で60分間反応させ、エンハンスケミルミネッセンス (Amersham) 法で抗原抗体複合体を検出した¹⁷⁾。

Ⅷ. 生細胞数の算定

細胞を24穴のクラスターディッシュ (Costar, Pleasanton, USA) に播種後経時的に0.25 % トリプシンで分散し、0.17 % (w/v) トリパンブルーを含む培地で希釈し血球計算板を用いて生細胞数を算定した¹⁸⁾。

成 績

I. TNF- α , 17 β -エストラジオール, AGEによる周皮細胞RAGE遺伝子の発現誘導

TNF- α , 17 β -エストラジオール, AGE存在下で周皮細胞のRAGE遺伝子の発現がどのように変化するかを定量的RT-PCR法にて検討した。まず、周皮細胞より分離した総RNA、ポリ(A)⁺RNAを鋳型としてRT-PCR産物のシグナル強度を鋳型量とサイクル数に対してプロットし¹⁹⁾、得られた検量曲線からRT-PCR反応の定量域を決定した。図3に示すように、総RNAを鋳型とした場合RNA量1000 ng以下、サイクル数45回以内、ポリ(A)⁺RNAを鋳型とした場合RNA量50 ng以下、サイクル数40回以内で反応が直線的に進行したので、以下の実験では総RNA量300 ng, サイクル数35回あるいはポリ(A)⁺RNA量30 ng, サイクル数30回という条件でRT-PCR反応を行った。内部対照の β -アクチンmRNA検出反応も同様の検量曲線に基づき鋳型総RNA量300 ng, ポリ(A)⁺RNA量30 ng, 増幅サイクル20回の条件で行った。

周皮細胞を種々の濃度のTNF- α , 17 β -エストラジオール, AGE-BSA存在下で4時間培養後、ポリ(A)⁺RNAを分離し、上記の条件下でRT-PCRを行った結果を図4に示す。TNF- α , 17 β -エストラジオール, AGE-BSAのいずれによってもRAGE mRNAレベルが増大することが見い出され、それぞれ100 ng/ml, 10 nM, 2 mg/mlの濃度で最も誘導された。このレベルは非添加対照の約3-4倍であった。つぎにピーク値を与えた各濃度下でRAGE mRNA誘導の経時変化を調べた。この結果、図5に示すように、TNF- α , 17 β -エストラジオール, AGE-BSA添加後4-8時間後にRAGE mRNAレベルはピークに達し、それ

ぞれ対照の約3倍に誘導された。 β -アクチン mRNAレベルは全経過を通じて不変であった。

Ⅱ. RAGE mRNAの安定性に及ぼすTNF- α , 17 β -エストラジオール, AGEの効果

TNF- α , 17 β -エストラジオール, AGE-BSAによるRAGE遺伝子発現誘導の分子機構を明らかにするため、周皮細胞を100 ng/ml TNF- α , 10 nM 17 β -エストラジオールあるいは2 mg/ml AGE-BSA存在下に4時間培養後、アクチノマイシンDを添加して転写を停止させ、経時的に総RNAを分離して定量的RT-PCRで分析し、RAGE mRNAレベルの減少率から半減期を求めた。その結果、図6に示す如くRAGE mRNAの半減期はいずれの場合でも約90-120分であり非添加対照の半減期 (100分) との間に有意差は認められなかった。

Ⅲ. TNF- α , 17 β -エストラジオールによるRAGE蛋白の増加

TNF- α , 17 β -エストラジオールによるRAGE mRNA誘導が、実際にRAGE蛋白の増加を伴っているかどうかをウェスタンブロット法により検討した。その結果、図7に示す如

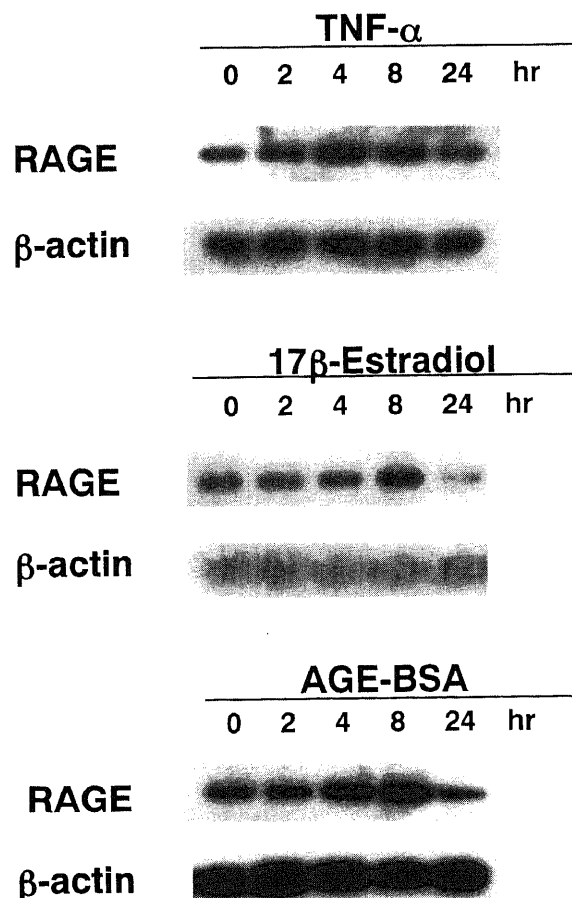


Fig. 5. Time course of RAGE mRNA induction by TNF- α , 17 β -estradiol and AGE-BSA. Pericytes were treated with 100 ng/ml TNF- α , 10 nM 17 β -estradiol or 2 mg/ml AGE-BSA for the indicated time periods, and then underwent poly(A)⁺ RNA isolation and RT-PCR.

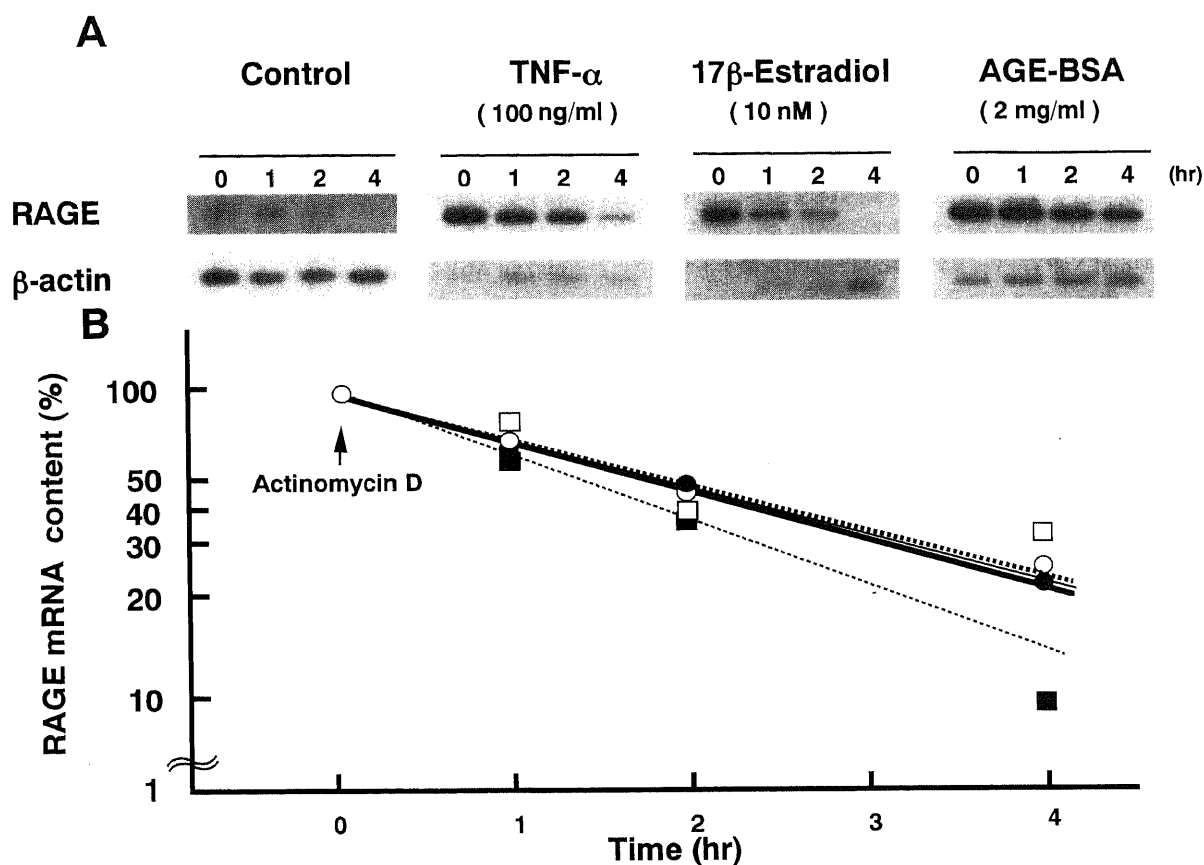


Fig. 6. RAGE mRNA stability in pericytes cultured with or without 100 ng/ml TNF- α or 10 nM 17 β -estradiol or 2 mg/ml AGE-BSA. (A) Southern blots of RT-PCR products. Pericytes were treated with these compounds for 4 h, and then with 10 μ g/ml actinomycin D, and further incubated in the basal medium containing 20 % fetal bovine serum for the indicated time periods. After incubation, total RNA was extracted, reverse-transcribed and PCR-amplified. Lower panels show the signals derived from β -actin mRNA. (B) Quantitative representation of the RAGE mRNA levels. Data were normalized with β -actin signals, and expressed as a percentage of the value at the time of actinomycin D administration. Bold line and \bullet , pericyte culture without additives; thin line and \circ , TNF- α -treated culture; dashed line and \blacksquare , 17 β -estradiol-treated culture; bold dashed line and \square , AGE-treated culture.

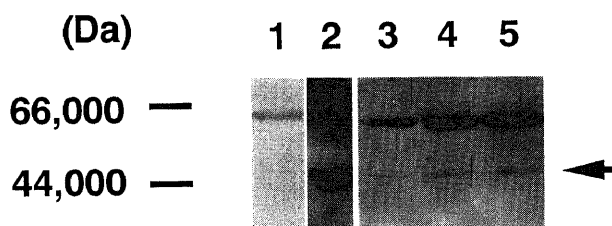


Fig. 7. Effects of TNF- α and 17 β -estradiol on RAGE protein contents of pericytes. Pericytes were treated with or without TNF- α or 17 β -estradiol for 24 h, and then lysed. Proteins extracted were electrophoresed on an SDS-polyacrylamide 12.5 % gel under reducing conditions, and subjected to Western blot analysis using anti-RAGE monoclonal antibody. Lane 1, negative control; extracts from pericytes cultured without additives were blotted and processed by the same visualization procedures except for omitting the first antibody. Lane 2, positive control; recombinant rat RAGE protein expressed in *Escherichia coli* and run in parallel. Lane 3, control; extracts from untreated pericytes. Lane 4, 100 ng/ml TNF- α -treated pericytes. Lane 5, 10 nM 17 β -estradiol-treated pericytes. Size markers are shown on the left in Da. Arrow indicates the position of RAGE protein. The upper band probably represented non-specific binding.

く周皮細胞は分子量約47,000DaのRAGE蛋白を発現しており、100 ng/ml TNF- α 、10 nM 17 β -エストロジオールの24時間処理でRAGE蛋白レベルは約2倍に誘導された。

IV. TNF- α によるAGEの周皮細胞増殖抑制効果の増強

このようなRAGE蛋白の発現誘導が機能上どのような影響を及ぼすかを調べるため、AGEの周皮細胞増殖抑制作用がTNF- α でどう修飾されるかを検討した。その結果、図8に示す如く、AGEによる周皮細胞の増殖抑制は100 ng/mlのTNF- α との共存により有意に増強された。すなわち、AGE単独では4日間の培養で周皮細胞の生細胞数は約18%程度抑制されたにすぎなかったが、TNF- α との共存では約27%程度の増殖抑制効果が認められた。

考 察

本研究により、周皮細胞におけるRAGE遺伝子の発現がTNF- α 、17 β -エストロジオール、AGEによって誘導されることがはじめて明らかにされた。抗RAGE抗体を用いた免疫染色により、糖尿病患者のAGEに富む血管病変²⁰⁾や粥状動脈硬化のプラーク病巣²¹⁾でRAGE蛋白が濃染されることが報告されている。本研究における知見から、このような病変における

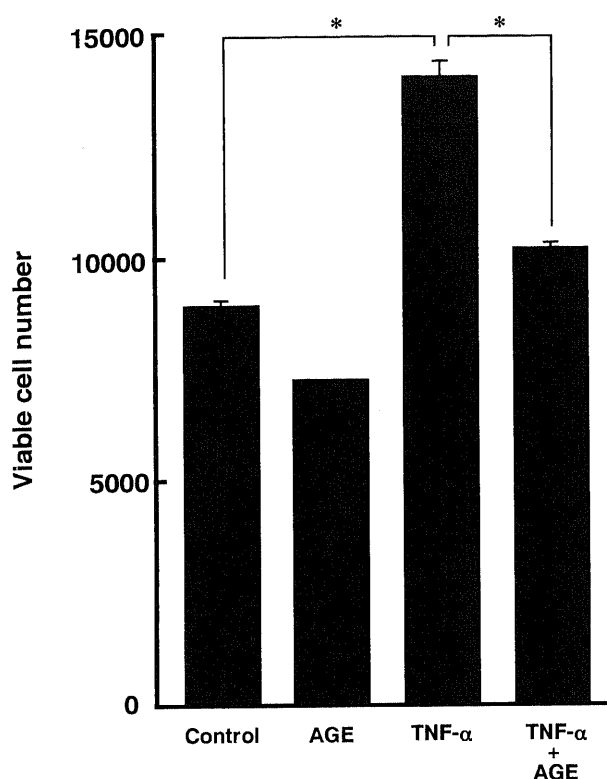


Fig. 8. The effects of $\text{TNF-}\alpha$ on the AGE-induced decrease in the number of viable pericytes. Pericytes were treated with or without 100 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ in the presence or absence of 1 mg/ml AGE-BSA for 4 days. Each column represents the mean value of viable pericyte numbers of 6 independent determinations; vertical bars show SEM. * $p < 0.0001$, compared to the values with 100 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ (Student's t test).

RAGE蛋白の発現誘導には共存しているAGEリガンド自身が関与している可能性が推定される。なお、RAGE遺伝子の発現を最も増大させた2 mg/mlというAGE濃度は周皮細胞の増殖抑制や急性毒性作用をきたす最大有効濃度と一致していた⁸⁾。本研究で、RAGE mRNAの安定性は $\text{TNF-}\alpha$ 、 17β -エストラジオール、AGE-BSAいずれによってもほとんど影響されないことから、これらの因子によるRAGE mRNAの誘導は転写段階での促進によるものと考えられる。RAGE遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域の解析では5'上流にある2つの核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 結合部位がリポポリサッカライドによる発現誘導に必須であることが最近報告された²²⁾。 $\text{TNF-}\alpha$ やAGEはそれぞれ細胞表面に存在する $\text{TNF-}\alpha$ 受容体やRAGEによって認識された後、細胞内に酸化ストレスを発生させNF- κ Bを活性化しうることから²³⁾²⁴⁾、これらの因子によるRAGE遺伝子の発現誘導もNF- κ Bを介する可能性が考えられる。

最近、糖尿病状態で認められるインスリン抵抗性の発生には脂肪細胞から過剰に分泌される $\text{TNF-}\alpha$ が関与していることが報告された²⁵⁾。したがって、脂肪細胞に由来する $\text{TNF-}\alpha$ は、血管細胞におけるAGE-RAGE系を活性化させ、周皮細胞の選択的喪失や血管新生を主徴とする糖尿病性細小血管症の危険因子または増悪因子の一つとなりうるであろう。 $\text{TNF-}\alpha$ による高インスリン血症は、血管平滑筋細胞の増殖促進²⁶⁾²⁷⁾やプラス

ミノゲンアクチベーターインヒビター産生刺激による血栓傾向²⁸⁾を介して粥状動脈硬化症などの糖尿病性大血管症の発症、進展にも関与するものと思われる。

本研究ではさらに、 17β -エストラジオールが周皮細胞におけるRAGE蛋白の発現を誘導することが認められた。RAGE蛋白の発現誘導が最も顕著であった10 nMというエストラジオール濃度が妊婦の血中エストラジオールレベル²⁹⁾とほぼ一致し、疫学的にも糖尿病性網膜症の進展が妊娠によって助長されることから³⁰⁾、筆者はエストラジオールが糖尿病患者でもRAGEを誘導してAGE作用を増強し、周皮細胞の選択的喪失の一因となりうるものと推定する。AGEはRAGEを介して内皮細胞にも作用し、血管新生や血栓傾向をひきおこしうる³¹⁾³²⁾ので、エストラジオールは糖尿病に伴う内皮変化をも増悪させると考えられる。

結 論

糖尿病性血管症の発症、進展に直接に関係するRAGE遺伝子の発現に及ぼす $\text{TNF-}\alpha$ 、 17β -エストラジオール、AGEの影響につき検討し、以下の新知見を得た。

1. $\text{TNF-}\alpha$ 、 17β -エストラジオール、AGEは周皮細胞におけるRAGE mRNAレベルを増大させる。
2. $\text{TNF-}\alpha$ 、 17β -エストラジオール、AGEはRAGE mRNAの安定性には影響せず、RAGE遺伝子の転写を促進させるものと推定される。
3. $\text{TNF-}\alpha$ と 17β -エストラジオールは実際RAGE蛋白量も増大させる。
4. $\text{TNF-}\alpha$ はAGEの周皮細胞増殖抑制効果を増強させる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました恩師渡辺洋字教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接のご指導を賜りました金沢大学医学部生化学第二講座の山本 博教授、山岸昌一講師に心から感謝致します。さらに御支援と御協力を頂きました浦山 博講師ほか金沢大学医学部第一外科学講座の皆様ならびに米倉秀人助教授をはじめ生化学第二講座の皆様感謝致します。最後に、抗ラットRAGEモノクローナル抗体を恵りいただきました京都大学医学部附属病院人工腎臓部土井俊夫講師に感謝いたします。

文 献

- 1) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318: 1315-1321, 1988
- 2) Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 50: 385-432, 1981
- 3) Vlassara H. Chronic diabetic complications and tissue glycosylation. *Diabetes Care* 13 (Suppl. 4): 1180-1185, 1990
- 4) Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproducts: Relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11047-11052, 1996
- 5) Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu F-T, Cerami A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): A new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med* 1: 634-646,

1995

- 6) Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan Y-CE, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267: 14998-15004, 1992
- 7) Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J, Guillausseau PJ, Stern D. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: A link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7742-7746, 1994
- 8) Yamagishi S, Hsu C-C, Taniguchi M, Harada S, Yamamoto Y, Ohsawa K, Kobayashi K, Yamamoto H. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: A possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 681-687, 1995
- 9) Yamagishi S, Yamamoto Y, Harada S, Hsu C-C, Yamamoto H. Advanced glycosylation end products stimulate the growth but inhibit the prostacyclin-producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS Lett* 384: 103-106, 1996
- 10) Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts-driven angiogenesis *in vitro*. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 272: 8723-8730, 1997
- 11) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54, 1976
- 12) Yamagishi S, Kobayashi K, Yamamoto H. Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 418-425, 1993
- 13) Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashita T, Yamashita J, Yamamoto H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 270: 28316-28324, 1995
- 14) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 15) Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9717-9721, 1989
- 16) Fischer S, Knöll R, Renz D, Karliczek GF, Schaper W. Role of adenosine in the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in porcine brain derived microvascular endothelial cells. *Endothelium* 5: 155-165, 1997
- 17) Kaji M, Yonemura Y, Harada S, Liu X, Terada I, Yamamoto H. Participation of *c-met* in the progression of human gastric cancers: anti-*c-met* oligonucleotides inhibit proliferation or invasiveness of gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 3: 393-404, 1996
- 18) Yamagishi S, Hsu C-C, Kobayashi K, Yamamoto H. Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 840-846, 1993
- 19) Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. Vascular aldosterone: Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269: 24316-24320, 1994
- 20) Schmidt AM, Yan SD, Stern D. The dark side of glucose. *Nat Med* 1: 1002-1004, 1995
- 21) Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A, Migheli A, Stern D. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143: 1699-1712, 1993
- 22) Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 272: 16498-16506, 1997
- 23) Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10: 2247-2258, 1991
- 24) Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Lutter T, Berentshtein E, Tritschler H, Müller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth P. Advanced glycation end products-induced activation of NF- κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 46: 1481-1490, 1997
- 25) Hotamisligil GS, Spiegelman BM. TNF- α : a key component of obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271-1278, 1994
- 26) Stout RW, Bierman EL, Ross R. Effect of insulin on the proliferation of cultured primate arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 36: 319-327, 1975
- 27) Stout RW. Insulin and atheroma: 20-yr perspective. *Diabetes Care* 13: 631-654, 1990
- 28) Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardisson JP, Heim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients - relationship with plasma insulin. *Thromb Hemostas*, 61: 370-373, 1989
- 29) Jaffe R B. The menopause and perimenopausal period. In Yen, S. S. C. & Jaffe, R. B. (eds), *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*. 2nd ed. p406-423, W. B. Saunders, Philadelphia, 1986
- 30) Klein BEK, Mose SE, Klein R. Effects of pregnancy on progression of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 13: 34-40, 1990

Mechanism for Induction of the Advanced Glycation Endproducts Receptor Gene and its Role in the Development and Progression of Diabetic Microangiopathy Hideki Fujimori, First Department of Surgery and Department of Biochemistry, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **107**, 16 — 23 (1998)

Key words pericyte, advanced glycation endproducts (AGE), receptor for AGE (RAGE)

Abstract

Advanced glycation endproducts (AGE), non-enzymatically glycosylated protein derivatives formed at an accelerated rate under diabetic state, are thought to play a central role in the pathogenesis of diabetic vascular complications. Recently, a cell surface receptor for AGE, termed RAGE, was identified and has been implicated in various cellular dysfunctions. The regulation of the RAGE gene, however, is not fully understood. In this study the author investigated how tumor necrosis factor- α (TNF- α), 17β -estradiol and AGE ligands affect the expression of the RAGE gene in bovine retinal pericytes, one cellular constituent of microvessels. First, TNF- α , 17β -estradiol and AGE-BSA were found to increase the levels of RAGE mRNA in dose-dependent manners. Second, the half-life of RAGE mRNA was not significantly changed by the TNF- α , 17β -estradiol or AGE-BSA treatments, suggesting that the induction is achieved at the transcription step. Third, TNF- α and 17β -estradiol actually increased RAGE protein contents in pericytes, and fourth, TNF- α enhanced the AGE-induced retardation of pericyte growth. These results thus suggest that TNF- α , 17β -estradiol and AGE inductions of the RAGE gene may augment the AGE actions, thereby contributing to the development and progression of diabetic microangiopathy exemplified by pericyte loss.